

Recombinant HBsAg hybrid particles having morphological characteristics of the HBsAg antigen and containing an immunogenic sequence which induces neutralizing antibodies directed against HIV or susceptible of being recognized by such antibodies. Nucleotide sequences coding for such particles and vaccines containing them

Patent number: FR2635532

Publication date: 1990-02-23

Inventor: TIOLLAIS PIERRE; MICHEL MARIE-LOUISE; MANCINI MARYLINE; SOBCZAK ELIANE

Applicant: PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED (FR)

Classification:

- **international:** A61K39/21; A61K39/29; A61K39/42; C12N15/51; G01N33/571; G01N33/576; G01N33/577

- **european:** C07K14/02; C07K14/16D

Application number: FR19880010336 19880729

Priority number(s): FR19880010336 19880729

Also published as:

 EP0354109 (A1)
 JP2211881 (A)
 EP0354109 (B1)
 PT91316 (B)
 DK373489 (L)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for FR2635532

Abstract of corresponding document: **EP0354109**

The invention relates to an active principle of a vaccine against HIV. This active principle consists of recombinant particles exhibiting the essential morphological characteristics of HBsAg particles and comprising, flush with the surface of these particles, the essence of the amino acid sequence (S) coded by the S region and, if appropriate, all or part of the amino acid sequence coded by the pre-S region of the genome of the hepatitis B virus, upstream of the said amino acid sequence (S), these recombinant particles being characterised in that they additionally comprise an immunogenic amino acid sequence inducing antibodies which are neutralising in respect of a retrovirus of the HIV class or capable of being recognised by such antibodies, this sequence itself comprising at least one epitope capable of being recognised by the B lymphocytes, and at least one epitope capable of being recognised by the T lymphocytes and, where appropriate, at least one site of attachment to the CD4 receptor of human T4 lymphocytes, this immunogenic sequence being either inserted in the pre-S amino acid sequence or wholly or partly substituted with the pre-S protein.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

This Page Blank (uspto)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 635 532

(21) N° d'enregistrement national :

88 10336

(51) Int Cl^e : C 12 N 15/51; A 61 K 39/21; G 01 N 33/576,
33/577; A 61 K 39/29, 39/42; G 01 N 33/571.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 29 juillet 1988.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR, Fondation privée
reconnue d'utilité publique et INSTITUT NATIONAL DE
LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE, Etablisse-
ment public. — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 8 du 23 février 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(72) Inventeur(s) : Pierre Tiollais ; Marie-Louise Michel ; Ma-
ryline Mancini ; Eliane Sobczak.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud.

(54) Particules HBsAg recombinantes hybrides : caractéristiques morphologiques de l'antigène HBsAg contenant 1
séquence immunogène induisant des anticorps neutralisants dirigés contre HIV ou susceptible d'être reconnue par
de tels anticorps; séquences nucléotidiques codant pour de telles particules; vaccins les contenant.

(57) L'invention concerne un principe actif de vaccin contre
HIV. Ce principe actif est constitué de particules recombi-
nantes présentant les caractéristiques morphologiques essen-
tielles des particules de HBsAg, et comprenant, affleurant à la
surface de ces particules, l'essentiel de la séquence d'acide
aminés S codé par la région S et le cas échéant tout ou partie
de la séquence d'acides aminés codée par la région pré-S du
génome du virus de l'hépatite B, en amont de ladite séquence
d'acides aminés S, ces particules recombinantes étant caracté-
risées en ce qu'elles comprennent en outre, une séquence
d'acides aminés immunogène induisant des anticorps neutrali-
sants vis-à-vis d'un rétrovirus de la famille HIV ou susceptible
d'être reconnue par de tels anticorps, cette séquence compor-
tant elle-même au moins un épitope susceptible d'être reconnu
par les lymphocytes B, et au moins un épitope susceptible
d'être reconnu par les lymphocytes T et le cas échéant au
moins un site d'attachement au récepteur CD4 de lymphocytes
T4 humains, cette séquence immunogène étant, soit insérée
dans la séquence d'acides aminés pré-S, soit substituée tout
ou partie de la protéine pré-S.

FR 2 635 532 - A1

D

1
PARTICULES HBsAg RECOMBINANTES HYBRIDES AYANT LES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE L'ANTIGENE HBsAg CONTENANT UNE SEQUENCE IMMUNOGENE INDUISANT DES ANTICORPS NEUTRALISANTS DIRIGES CONTRE HIV OU 5 SUSCEPTIBLE D'ETRE RECONNUE PAR DE TELS ANTICORPS. SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DE TELLES PARTICULES. VACCINS LES CONTENANT.

La présente invention concerne des particules recombinantes hybrides ayant les caractéristiques morphologiques de l'antigène HBsAg comprenant des séquences d'acides aminés immunogènes induisant des anticorps neutralisants dirigés contre les rétrovirus de la famille de HIV ou capables d'être reconnues par de tels anticorps.

15 L'invention vise également des acides nucléiques recombinants ou vecteurs recombinants, comprenant eux-mêmes les insérats formés par des acides nucléiques recombinants hybrides, éventuellement sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases d'un hôte 20 cellulaire eucaryote, ces acides nucléiques recombinants portant l'information génétique requise pour rendre cet hôte cellulaire eucaryote apte à produire les particules hybrides recombinantes sus-mentionnées. L'invention a aussi pour objet des hôtes cellulaires eucaryotes 25 transformés par les vecteurs recombinants précédents.

La présente invention propose, par l'intermédiaire des particules recombinantes ci-dessus, de nouveaux moyens de prévention contre le SIDA ou contre les symptômes précurseurs du SIDA notamment des syndrômes 30 lymphadénopathiques (SLA).

L'invention concerne plus particulièrement des particules recombinantes de ce type qui ont la capacité d'induire la formation d'anticorps neutralisants vis-à-vis des rétrovirus HIV et leur application pour 35 l'élaboration de compositions vaccinantes pour lutter

contre une infection due à un rétrovirus HIV.

L'invention a également pour objet des peptides et polypeptides adéquats ayant des propriétés immuno-gènes protectrices contre le SIDA, notamment des polypeptides de l'enveloppe d'un rétrovirus HIV ou SIV pour la réalisation des particules recombinantes ci-dessus.

10 L'invention se rapporte également à des acides nucléiques codant pour ces peptides et polypeptides ainsi qu'aux vecteurs les contenant.

15 L'invention vise également l'utilisation des moyens ci-dessus pour réaliser le diagnostic *in vitro* d'une infection due à HIV.

20 On sait maintenant que des agents étiologiques responsables du développement de syndrômes de lymphadénopathies (SLA) précédent souvent le développement de syndrôme d'immunodéficience acquise (SIDA).

25 On a désigné par HIV (abréviation anglaise de "Human Immunodéficiency Virus") plusieurs rétrovirus humains susceptibles, dans certaines conditions, de provoquer un SLA, éventuellement relayé par un syndrôme d'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'homme.

30 Ainsi un premier virus dénommé LAV-1 ou HIV-1 a été isolé et décrit dans la demande de brevet GB.83/24.800 et une demande EP.84/401.834 du 14/09/84. Ce virus a également été décrit par F. Barre Sinoussi et al. dans *Science*, 220 n° 45-99, 20, pages 868-871.

35 Des variants de ce virus HIV-1 désignés par LAV ELI et LAV MAL, ont également été isolés, caractérisés et décrits dans la demande de brevet EP.84/401.834.

40 L'isolement et la caractérisation de rétrovirus appartenant à une classe distincte et n'ayant qu'une parenté immunologique réduite avec les précédents, ont

5 été décrits dans la demande de brevet européen n° 87/400.151.4. publiée sous le n° 239.425. Ces rétrovirus qui ont été regroupés sous la désignation HIV-2, ont été isolés chez plusieurs malades africains présentant des symptômes d'une lymphadénopathie ou d'un SIDA.

10 L'étude de ces rétrovirus HIV, l'isolement et l'analyse de leurs séquences nucléotidiques, ainsi que la caractérisation de leurs protéines antigéniques a permis d'effectuer des études comparatives entre les différentes souches obtenues au niveau de leur parenté ou au contraire de leurs spécificités tant structurales que fonctionnelles.

15 Ces rétrovirus HIV-1 et HIV-2 ont également été étudiés en comparaison avec un rétrovirus d'origine simienne (désigné par l'abréviation SIV ou STLV-III) et cette étude a permis de montrer une parenté immunologique entre les protéines et glycoprotéines du rétrovirus HIV-2 et de ses variants et celles du rétrovirus SIV. La glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus SIV 20 réagit immunologiquement avec des anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus HIV-2 et vice-versa. En revanche les glycoprotéines d'enveloppe du rétrovirus SIV ou du rétrovirus HIV-2 ne donnent pas lieu à des réactions immunologiques croisées avec les glycoprotéines d'enveloppe du rétrovirus HIV-1.

25 Les études réalisées sur la structure des antigènes de surface de ces rétrovirus ont conduit les inventeurs à s'intéresser plus spécialement aux propriétés immunogènes de différents peptides et polypeptides appartenant à ces antigènes, notamment aux glycoprotéines d'enveloppe, ou aux glycoprotéines transmembranaires de ces rétrovirus.

30 Différents peptides et polypeptides caractéristiques dont les séquences sont contenues dans les structures peptidiques de ces glycoprotéines, soit

directement issus de ces rétrovirus, soit synthétisés par voie chimique, présentent une immunogénicité relativement faible.

Dans le cadre de la présente invention les inventeurs ont recherché et défini des moyens susceptibles de renforcer l'immunogénicité de tels peptides ou polypeptides dérivés des glycoprotéines d'enveloppe ou des glycoprotéines membranaires de HIVs - ou élaborés à partir de la connaissance de leurs séquences respectives, - ou encore de séquences fonctionnellement voisines, en particulier pour les rendre aptes à induire in vivo la formation d'anticorps neutralisants vis-à-vis d'un ou plusieurs rétrovirus du type HIV.

Plus précisément, les inventeurs ont orienté leurs travaux vers la mise au point d'une structure biologique mixte dont l'un des éléments est constitué par les susdits peptides ou polypeptides, l'autre par des particules ayant les propriétés immunogéniques et immunologiques essentielles de l'antigène de surface (souvent désigné par l'abréviation HBsAg ou encore plus simplement HBs) du virus de l'hépatite B.

Des particules ayant les propriétés morphologiques et immunogéniques essentielles de l'antigène HBsAg naturel, et produites par expression du gène S du virus de l'hépatite B dans des cellules eucaryotes, ont été décrites dans le brevet européen n° 0038765 déposé le 22 avril 1981. On rappelle brièvement que ces particules HBs ont une taille approximative de 17 à 25, notamment 22 nm de diamètre. Elles ont également été décrites dans l'article scientifique correspondant de M.F. DUBOIS et al, (1980), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 4549-4553). Des particules semblables ont été obtenues dans des levures (P. VALENZUELA et al, (1982), Nature, 298, 347-350) ou par l'intermédiaire de virus recombinants (G.L. SMITH et al, (1983), Nature, 302, 490-495).

Une méthode pour produire ces particules comprend la transformation de cellules eucaryotes par un vecteur approprié, contenant le gène S sous la dépendance d'un promoteur efficace dans ces cellules eucaryotes, la culture des cellules transformées et la récupération des particules produites, soit à partir des cellules préalablement lysées, soit à partir du milieu de culture, lorsque les particules y ont été excrétées par les lignées cellulaires utilisées (notamment dans le cas de l'utilisation de lignées cellulaires de singe, de hamster, de souris etc...)

Le polypeptide majeur des particules HBs, codé par le gène S a un poids moléculaire (PM) d'environ 25400 daltons. Ce poids moléculaire est de l'ordre de 27000 daltons lorsque la protéine majeure est sous forme glycosylée.

Dans le cadre de l'invention, les inventeurs se sont également intéressés à la préparation de protéines de PM plus élevé (de l'ordre de 34000 daltons), contenant non seulement la séquence polypeptidique du susdit polypeptide majeur codée pour la région S, ayant la même extrémité C-terminale que le polypeptide majeur et en outre une séquence supplémentaire de 55 acides aminés en position N-terminale (STIBBE X. et GERLICH W.H., (1983), J. Virology, 46, 626-628) codée par la région pré-S2 du génome de l'hépatite B. Les inventeurs ont aussi étudié des particules résultant de la transcription des régions S, pré-S1 et pré-S2 (l'ensemble de ces deux domaines est appelé région pré-S).

Les protéines recombinantes ci-dessus s'assemblent en particules d'une taille approximative de 22 nm.

L'invention résulte de la conjonction dans une entité commune de facteurs concourant au résultat recherché à savoir :

1/ un support consistant en des particules de HBsAg

comprenant plusieurs sites épitopiques T et B, dont l'immunogénicité protectrice est acquise, quand elles n'ont pas été modifiées (et lorsque ses protéines de surface comprennent la séquence d'acides aminés codée par 5 la région pré-S du génome du virus de l'hépatite B),
2/ un épitope T immunogène dérivé d'une glycoprotéine d'enveloppe de HIV,
3/ un épitope B appartenant également à une glycoprotéine d'enveloppe de HIV et selon la forme de réalisation de l'invention,
10 4/ avantageusement d'un site d'attachement au récepteur CD4- de lymphocytes T4. Ce site, en combinaison avec les facteurs précédents, participerait à l'induction *in vivo* des anticorps neutralisants contre HIV et à l'induction 15 d'une réponse cellulaire, accompagnée d'une action bloquante des anticorps formés, dès lors qu'ils sont dirigés contre un site de fixation du virus.

Le but que les inventeurs se sont fixé a été atteint grâce à la réalisation de particules hybrides 20 recombinantes présentant les caractéristiques morphologiques essentielles des particules de HBsAg, et comprenant, affleurant à la surface de ces particules, l'essentiel de la séquence d'acides aminés (S) codée par la région S et le cas échéant, tout ou partie de la 25 séquence d'acides aminés codée par la région pré-S du génome du virus de l'hépatite B en amont de ladite séquence d'acides aminés (S), ces particules recombinantes étant caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre, une séquence d'acides aminés immunogène induisant des anticorps neutralisants vis-à-vis d'un 30 rétrovirus de la famille HIV, ou susceptible d'être reconnue par de tels anticorps, cette séquence comportant elle-même au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes B, au moins un épitope 35 susceptible d'être reconnu par les lymphocytes T, cette

séquence immunogène étant, soit insérée dans la séquence d'acides aminés pré-S, soit substituée tout ou partie de la protéine pré-S.

De façon particulièrement avantageuse les 5 particules hybrides recombinantes ci-dessus comprennent en outre un site d'attachement au récepteur CD4 de lymphocytes T4 humains.

L'invention concerne aussi un vecteur recombinant pour la transformation ultérieure de cellules 10 pétentes, alors aptes à produire de telles particules.

Le vecteur recombinant selon l'invention comprend un fragment d'acide nucléique correspondant à la région S et le cas échéant à tout ou partie de la région pré-S de l'antigène majeur de surface du virus de 15 l'hépatite B, et permettant lorsqu'il est introduit dans un hôte cellulaire eucaryote compétent, d'induire la production de particules, ayant les caractéristiques morphologiques essentielles de l'antigène HBsAg et comprenant une séquence d'acides aminés caractéristique de 20 la protéine S de l'antigène HBsAg, à l'occasion de la culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé et, de préférence, l'excrétion de ces particules dans le milieu de culture, ce vecteur recombinant étant caractérisé :

- en ce qu'il comprend en outre une séquence nucléotidique exogène codant pour une séquence d'acides aminés immunogène induisant des anticorps neutralisants vis-à-vis d'un rétrovirus de la famille de HIV ou susceptible d'être reconnue par de tels anticorps, comprenant au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les 30 lymphocytes B, et au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes T, et
- en ce que ladite séquence nucléotidique exogène est soit insérée dans ladite région pré-S, soit substituée à tout ou partie de la dite région pré-S.

35 Avantageusement, la séquence nucléotidique ex-

gène code pour une séquence d'acides aminés immunogène telle que définie ci-dessus et qui comprend en outre un site d'attachement au récepteur CD4.

Dans un mode de réalisation préféré du vecteur recombinant, le fragment d'acide nucléique correspondant à la région S et le cas échéant à tout ou partie de la région pré-S est placé sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases d'un hôte cellulaire euacryote.

L'incorporation des séquences caractéristiques de HIV dans la région pré-S (ou la substitution partielle ou totale de cette région pré-S par lesdites séquences caractéristiques) permet à la fois l'expression et l'exposition des séquences issues de HIV à la surface des particules ayant conservé les caractéristiques essentielles des particules HBsAg, et ce dans une conformation autorisant la conservation de leur immunogénicité naturelle et leur amplification, au point de les rendre aptes à induire in vivo la formation d'anticorps neutralisants vis-à-vis d'un rétrovirus HIV.

Avantageusement on a recours à des vecteurs recombinants comprenant des séquences nucléotidiques exogènes issues de HIV, choisies parmi celles qui présentent un grand degré de conservation au sein de différents isolats de rétrovirus HIV.

La longueur des séquences nucléotidiques insérées dans l'enchaînement nucléotidique comprenant la région S et le cas échéant tout ou partie de la région pré-S, doit être compatible avec le maintien des propriétés structurales et conformationnelles (morphologiques) essentielles des particules porteuses HBs. Cette longueur dépend dans une certaine mesure de la partie déletée de la région pré-S à titre indicatif ... mais non limitatif ... cette longueur correspond à une séquence de 5 à 100 résidus aminoacides. La longueur de

la séquence insérée peut dans certaines formes de réalisation de l'invention, excéder celle de la séquence déletée.

Dans un mode de réalisation préféré des vecteurs recombinants selon l'invention, la séquence nucléotidique exogène est insérée dans la phase de lecture appropriée, dans la région pré-S (ou en amont du gène S) sous le contrôle d'un promoteur issu du SV40.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'acide nucléique recombinant est caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène (issue de HIV) est substituée à la plus grande partie, sinon la totalité de la région pré-S2.

En d'autres termes, la région pré-S2 subsistant après l'insertion de ladite séquence nucléotidique exogène est pratiquement entièrement déletée, la séquence nucléotidique exogène étant alors directement intercalée entre la région S, et la région pré-S1. Par séquence nucléotidique exogène, on entend les séquences dont les définitions sont données dans les pages précédentes ainsi que celles qui seront exemplifiées dans la suite. Entrent toutefois dans le cadre de l'invention des vecteurs transformés susceptibles de favoriser l'intégration dans le fragment d'acide nucléique de HBs, des susdites séquences nucléotides exogènes.

Des vecteurs recombinants particulièrement adaptés à l'expression des séquences nucléotidiques exogènes dans le cadre des propriétés recherchées, résultent de la recombinaison d'un vecteur d'expression connu de HBsAg, désigné par pSVS (voir à ce sujet la référence 11) et d'une séquence exogène, issu de HIV-2 portée par un vecteur de clonage M13tg130.

Un tel vecteur résulte de l'insertion de la séquence exogène dans la région pré-S2 de HBsAg (vecteur pM2S qui contient (la séquence pré-S1) ou de la

substitution d'une partie de la région pré-S par la séquence exogène (pSV2S dans lequel la région pré-S1 a été déletée). Ces deux vecteurs, non limitatifs des possibilités de réalisation de l'invention, contiennent 5 une séquence nucléotidique exogène caractéristique de la glycoprotéine externe d'enveloppe de HIV-1 obtenue par clonage et désignée par "clone 8". Elle est présentée à la figure 6.

D'autres constructions peuvent être obtenues en 10 remplaçant la séquence de HIV-1 ci-dessus par les séquences nucléotidiques de HIV-2 ou de SIV correspondantes, ou encore par des séquences modifiées, immunologiquement équivalentes, capables cependant *in vivo* la production d'anticorps neutralisants dirigés contre un 15 rétrovirus HIV.

A titre d'exemple, les séquences insérées de façon préférée dans les enchaînements de nucléotides ci-dessus sont les séquences nucléotidiques codant pour l'une des séquences d'acides aminés suivantes :

20 X_1 CHIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z_1
 X_2 CHIKQIINTWHKGRNVYLPPREGELSC Z_2
 X_3 CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z_3

dans lesquelles les couples X_1 , Z_1 ; X_2 , Z_2 et X_3 , Z_3 25 représentent soit des groupements COOH ou NH₂, soit des séquences d'acides aminés normalement respectivement associées aux parties centrales correspondantes des séquences sus-indiquées dans les glycoprotéines des rétrovirus SIV, HIV-2, HIV-1 qui normalement les contiennent : ces séquences comprenant notamment au total, 30 jusqu'à 100 acides aminés.

D'autres séquences nucléotidiques également préférées sont celles qui codent pour les séquences d'acides aminés suivantes :

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLLTQXPKERHKNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYL

35 PREGDLTCNSTVTSlianinwtDG ;

RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGKRVYLPPREGELSCNS
TVTSIIANIDWQNN ;
GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTESDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN ;

5 Dans un mode de réalisation particulier des particules ci-dessus la séquence d'acides aminés exogène est soit insérée dans la séquence peptidique codée par la région pré-S2 du génome du virus de l'hépatite B, soit substituée à tout ou partie de cette séquence
10 Peptidique.

De façon préférée, les particules hybrides recombinantes contiennent une séquence d'acides aminés exogène choisie parmi celles qui ont déjà été indiquées à titre d'exemples préférés :

15 X_1 CHIROQIINTWHKVGKRVYLPPREGDLTC Z_1
 X_2 CHIKQIINTWHKVGKRVYLPPREGELSC Z_2
 X_3 CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z_3

20 Ces séquences particulières présentent des caractéristiques fonctionnelles intéressantes, notamment en ce qu'elles contiennent dans une séquence commune issue de HIV un site d'attachement aux lymphocytes T et récepteurs CD4 et un épitope T très proche l'une de l'autre.

25 Une extension de l'application de l'invention consiste dans la réalisation d'un vecteur recombinant exogène caractéristique d'une glycoprotéine d'enveloppe de HIV mais dépourvu de la séquence codant pour le site d'attachement au récepteur CD4. Une telle séquence exogène insérée dans la région pré-S définie ci-dessus 30 peut conduire de façon intéressante à la formation de particules hybrides recombinantes capables de présenter à leur surface les épitopes susceptibles d'être reconnus par les lymphocytes B et les lymphocytes T et capables respectivement de contribuer à l'induction d'anticorps 35 ou d'une réponse cellulaire.

Des séquences d'acides aminés exogènes préférées de l'invention, contiennent des séquences peptidiques respectivement caractéristiques des virus SIV, HIV-2, HIV-1 et ont les séquences suivantes :

5 RGEFLYCKMNWFLNWEDRSLTQKPKERHKRNYVPCHI**QIINTWHKVGK**NVYLP
 PREGDLTCNSTVTSILIANINWTDG
 RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIK**QIINTWHKVG**RVYLPPREGELCNS
 TVTSII**ANIDWQNN**
 GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNT**EGSDTITLPCRIKQF**INMWQEVGKAM

10 YAPPIS**QI**RCSNNIT**GLLLTRDGGNN**

D'autres séquences peptidiques exogènes peuvent entrer dans le cadre de l'invention dès lors que les propriétés recherchées pour les particules recombinantes et qui ont été précédemment définies, sont respectées.

15 Les peptides et polypeptides immunogènes caractéristiques de HIV ou de SIV qui entrent dans le cadre de l'invention peuvent être obtenus par synthèse selon les techniques décrites dans le brevet US 4629783 délivré le 16 Décembre 1986 à la société GENETIC 20 SYSTEMS.

25 D'autres méthodes dont les principes sont résumés ci-après, pourront être mises en oeuvre.

Un principe de synthèse est par exemple de mettre en présence une phase solide dans laquelle 25 s'assemble la séquence du peptide et une phase liquide contenant solvants et réactifs. A chaque étape la séparation entre le peptide en croissance et les réactifs se fait par simples filtrations et lavages.

Initialement, le support solide qui porte un 30 groupement réactif réagit avec le carboxyle d'un acide aminé introduit avec son α -NH₂ bloqué (protégé par exemple par le t-butyloxy carbonyle), pour établir une liaison covalente. Après déprotection de la fonction aminée (par exemple en lavant avec un acide tel que 35 l'acide trifluoroacétique), un deuxième acide aminé

protégé est introduit pour former par couplage la première liaison peptidique. Le deuxième acide aminé, qui fournit le deuxième amino-acyle de la séquence, est couplé à partir du résidu amino-acyle C-terminal sur la fonction amine déprotégée du premier acide aminé C-terminal de la chaîne. De préférence la fonction carboxyle de ce deuxième acide aminé est activée, par exemple par dicyclohexylcarbodiimide. Par une suite de réactions, déprotections et couplages, la synthèse 5 progresse du résidu C- vers le résidu N-terminal. Lorsque la séquence voulue a été assemblée le peptide 10 est décroché de la phase solide, par une réaction spécifique de coupure de la liaison peptide-résine établie initialement.

15 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrit par HOUBENWEYL dans l'ouvrage intitulé "Méthode der Organischen Chemie" (Méthode de la Chimie Organique) édité par E. Wunsch, 20 vol. 15-I et II, THIEME, Stuttgart 1974.

25 Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux-à-deux les aminoacyles successifs dans l'ordre requis, ou à condenser des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore 30 plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides. En variante, on pourra avoir 35 recours à des réactions de couplage mettant en jeu des

réactifs de couplage classique, du type carbodiimide, tels que par exemple la 1-ethyl-3-(3-diméthyl-amino-propyl)-cdarbodiimide. Lorsque l'aminoacyle mis en oeuvre possède une fonction acide supplémentaire 5 (notamment dans le cas de l'acide glutamique), ces fonctions seront par exemple protégées par des groupes t-butylester.

L'invention se rapporte aussi à un hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant parmi ceux 10 qui ont été précédemment décrits et compétents pour assurer l'expression de l'insérat contenu dans ce vecteur recombinant.

A titre d'exemple, l'expression de la particule hybride recombinante HIV-HBs peut être assurée dans 15 différents types cellulaires par des vecteurs plasmidiques ou viraux, par exemple les pox virus (du type du virus de la vaccine, les adénovirus, les baculo virus). Les techniques d'infection ou de transfection selon qu'il s'agit de virus ou de plasmide sont bien connues 20 de l'homme de l'art. On pourra pour cela se reporter au brevet français n° 245.136 ou à la demande de brevet européen publiée sous le n° 265.785.

A titre d'exemple d'hôtes cellulaires adaptés pour la réalisation de l'invention, on mentionne des 25 cellules eucaryotes de mammifère par exemple des cellules CHO, ou encore des levures, par exemple Saccharomyces cerevisiae..

Les procédés de transformation mis en oeuvre pour obtenir l'expression de l'insérat du vecteur (et de 30 mise en évidence du produit d'expression) sont en eux-mêmes classiques, comme il résulte des exemples qui suivent.

L'invention vise par ailleurs une composition vaccinante contre des infections dues à un rétrovirus 35 HIV, caractérisée en ce qu'elle comprend en tant que

principe actif, des particules recombinantes hybrides telles décrites dans les pages précédentes, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

L'administration de ces compositions à un patient pourra être faite en utilisant des doses contenant d'environ 5 à environ 20 µg de particules recombinantes hybrides purifiées par dose. Ces doses seront par exemple administrées trois fois à un mois d'intervalle.

10 L'invention concerne également un procédé de préparation d'un vecteur recombinant, caractérisé par les étapes suivantes :

- la recombinaison génétique *in vitro* le cas échéant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases d'un hôte cellulaire eucaryote approprié, 15 d'une part d'une séquence nucléotidique exogène codant pour une séquence d'acides aminés immunogène, induisant des anticorps neutralisants vis-à-vis d'un rétrovirus de la famille de HIV ou susceptible d'être reconnue de tels anticorps, cette séquence exogène comprenant au moins un 20 épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes B, et au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes T, et d'autre part, un enchainement de nucléotides correspondant à la région S et le cas échéant à tout ou partie de la région pré-S du génome du 25 virus de l'hépatite B et

- la récupération du vecteur recombinant formé comprenant les éléments tels qu'ils ont été définis plus haut.

Un procédé semblable peut être appliqué pour obtenir la formation d'un vecteur recombinant précédem- 30 ment défini, dans lequel la séquence exogène insérée code pour une séquence d'acides aminés comprenant en outre un site d'attachement au récepteur CD4.

La récupération du vecteur recombinant peut être réalisée par les procédés connus, notamment par hybridation sélective avec, d'une part, des sondes nucléotidi- 35 ques caractéristiques des séquences correspondantes du

génome d'un rétrovirus HIV, d'autre part, avec des sondes caractéristiques de la région S du génome du virus de l'hépatite B.

L'invention se rapporte aussi à des compositions pour le diagnostic *in vitro* d'une infection due à HIV par détection de la présence d'anticorps neutralisants dans un milieu biologique d'un patient. De telles compositions comprennent des particules hybrides recombinantes exprimant à leur surface un ou plusieurs des polypeptides ou peptides de HIV-1 ou HIV-2 ou SIV, ou un mélange de ces particules hybrides recombinantes.

L'invention concerne aussi l'utilisation de ces particules hybrides recombinantes pour réaliser un test de diagnostic *in vitro* de la présence d'anticorps résultants d'une infection par HIV caractérisé par :

- la mise en contact d'un milieu biologique d'un patient avec des particules recombinantes hybrides,
- la détection du produit de réaction éventuellement formé à savoir un complexe antigène-anticorps.

Les moyens de détection du complexe antigène-anticorps sont ceux connus de l'homme de l'art notamment le marquage radioactif. Le test pourra, selon la composition des particules hybrides recombinantes, être appliqué pour le diagnostic sélectif de HIV-1 ou HIV-2, ou pour le diagnostic non sélectif grâce à l'utilisation de compositions comprenant des particules exprimant à leur surface des séquences de HIV-1 et de HIV-2 ou une séquence caractéristique des deux virus à la fois.

De même l'invention concerne un procédé pour le diagnostic *in vitro* d'une infection due à HIV, caractérisé par les étapes suivantes :

- mise en contact d'une composition ci-dessus définie avec un milieu biologique d'un patient susceptible de contenir des anticorps neutralisants contre HIV,
- détection de la formation d'un éventuel complexe antigène-anticorps.

Par milieu biologique on entend tout échantillon susceptible de contenir des anticorps, tel que le sérum d'un patient.

L'invention vise encore un procédé pour la production des particules hybrides recombinantes ci-dessus, caractérisé par les étapes suivantes :

- la transformation d'un hôte cellulaire déterminé avec un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, dont le promoteur éventuellement présent dans le vecteur est reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire transformé,
- la culture de l'hôte cellulaire sur un milieu approprié et la récupération des particules formées, plus particulièrement celles excrétées dans le milieu de culture. Ces particules sont alors caractérisables non seulement par leur caractéristiques morphologiques et leur réactivité immunologique avec des anticorps anti-HBs, mais également par leur aptitude à être reconnues par les anticorps anti-HIV correspondants ou à induire de tels anticorps.

D'autres caractéristiques et avantages particulières de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent et qui sont illustrés par les figures.

MATERIELS ET METHODES

Construction de vecteur

M13tg130 est un vecteur de clonage dérivé du bactériophage M13. Comme l'on décrit KIENY et al (14), il contient dans la séquence 5' du gène codant pour la beta-galactosidase, 11 sites uniques de restriction constituant un polyadaptateur (polylinker) (voir figure 1). L'insertion de fragments d'ADN exogène dans ce "polylinker" peut être détectée par absence de coloration par X-gal. Le criblage des plaques bleues par hybridation *in situ* permet la détection des fragments d'ADN insérés en phase.

Le vecteur d'expression de HBsAg, pSVS (11) a été modifié pour y insérer le segment EcoRI -SalI de l'ADN de M13tg130 contenant 10 sites de restriction entre les sites EcoRI et XhoI de la région pré-S2 du génome du virus de l'hépatite B encore désigné par HBV (abréviation anglaise de Hépatitis B virus). La fusion entre les sites de restriction SalI et XhoI restaure le cadre de lecture dans la région pré-S2. La région pré-S1 du vecteur résultant pM2S a ensuite été déletée. Le vecteur obtenu a été désigné par pSV2S. Dans cette construction, la fusion entre l'ADN cloné et le gène S adjacent à la région pré S2 est placée sous le contrôle direct du promoteur précoce de SV40.

En utilisant des moyens analogues, on a obtenu un vecteur désigné par pSVS XL par recombinaison entre pSVS et pM2S au niveau des sites XhoI et SmaI respectivement.

Transfection des cellules animales

Des cellules d'ovaire de hamster chinois dhfr⁻ (CHO) du clone DXB11 (15) ont été maintenues sous forme de monocouche dans un milieu Ham F12 complété avec 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules ont été transférées en utilisant la méthode au phosphate de calcium décrite dans la référence (16) avec un choc au glycérol 6 heures plus tard (Parker et al. 1979). Une cotransfection avec le vecteur pSV2 dhfr selon le principe rappelé dans la référence (17) permet la sélection des clones stables exprimant les protéines de fusion avec HbsAg (encore appelées protéines recombinantes). L'amplification des séquences transformantes a été obtenue en procédant à une culture cellulaire en présence de concentrations croissantes de méthothréxate (MTX) (18).

Production et purification des particules recombinantes de HIV-HBsAg.

Des clones stables exprimant les particules recombinantes de HBsAg ont été cultivées jusqu'à 5 confluence et ont été alimentés tous les trois ou quatre jours avec un milieu de culture contenant seulement 5 % de sérum de veau foetal. Les surnageants de cultures cellulaires ont été récupérés, clarifiés et les particules de HBsAg ont été concentrées par 10 précipitation par le sulfate d'ammonium et purifiées à deux reprises dans un gradient isopycnique de CsCl suivi par un gradient de vitesse en sucre de 0 à 20 %.

Immunoblots

15 1 µg environ des particules recombinantes purifiées a été soumis à ébullition dans un tampon de Laemmeli, séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dodecyl sulfate de sodium 12,5% (NaDODSO₄) et électrotransféré sur des filtres de nitrocellulose (SCHLEICHER & SCHULL).

20 Les protéines immobilisées sur les filtres ont réagi avec les différents antisérum suivants : a-p49a (19), antisérum anti-peptide de lapin spécifique de HBsAg, 18/7 (20) anticorps spécifique de la région pré-S1 de HBV et un antisérum dirigé contre les régions 25 de la GP160 de HIV1 (figure 2) obtenu à partir de lapins en utilisant des peptides synthétiques couplés avec un sérum albumine bovine (BSA : abréviation anglaise de "bovine serum albumine") ou l'hémocyanine limpet keyhole (abréviation anglaise : KLH).

30 Les protéines immunoréactives finales ont été détectées par des anticorps anti-lapin ou par des immunoglobulines de souris conjuguées avec de la peroxydase (AMERSHAM) et ont été révélées avec la diaminobenzidine.

Immunisations et mesures de la production d'anticorps

Des lapins ont été immunisés deux ou trois fois à un mois d'intervalle par injection intradermique 5 d'environ 4 µg de particules recombinantes de HBsAg purifiées (tableau 1) dans l'adjuvant complet de Freund. Des séra ont été obtenus 30 jours après la dernière injection.

Ces antiséra ont été testés pour connaître leur 10 niveau de production d'anticorps, par la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), en utilisant, en phase solide, des particules HBsAg dérivées du plasma (Hevac B.Pasteur, produit par Pasteur Vaccins France) ou des peptides synthétiques caractéristiques de HIV (voir 15 figure 2). Les peptides synthétiques ont été fournis par Monsieur le Dr ROCHAT (UA. 553, CNRS MARSEILLE). Tous les antigènes ont été utilisés à une concentration de 1 µg/ml sur des plaques de microtitrage (FALCON "Probind") et les tests ELISA ont été réalisés comme décrit par 20 CHARBIT et al (21).

Essais sur les anticorps neutralisants

Pour mettre en évidence l'activité neutralisante des anticorps contenus dans les séra, on a utilisé des lymphocytes stimulés du sang périphérique humain (PBL). 25 Ces cellules ont été utilisées pour leur sensibilité à l'infection à HIV. Différents échantillons d'un isolat LAV_{BRU} décrit par MONTAGNIER et al (22) ont été utilisés comme inoculum de virus. Chaque dilution de sérum a été pré-incubée avec un volume égal d'inoculum viral pendant 30 1 heure à 37°C. Le mélange a ensuite été ajouté à une quantité de $4 \cdot 10^6$ PBL humains dans un milieu RPMI 16-40 complété avec 10 % de sérum de veau foetal contenant 20 U./ml d'interleukine, 2,2 µg/ml de polybrène et 25 U./ml de séra anti-interféron.

35 Après 1 heure d'incubation à 37°C, les cellules

ont été rincées et cultivées dans des milieux RPMI complets. Les surnageants ont été retirés deux fois par semaine et les mêmes dilutions des séra testés ont été ajoutées dans les nouveaux milieux les deux premières fois. Les surnageants ont été congelés à -70°C et testés pour connaître leur activité reverse-transcriptase (activité RT) (23).

RESULTATS

Clonage des fragments du gène d'enveloppe de HIV 10 dans un vecteur d'expression eucaryote de HBsAg

Le clonage a été réalisé en deux étapes :
Dans une première étape, on a construit une banque génomique d'expresssion, dans le bactériophage M13tg130 et les fragments d'ADN sélectionnés ont été 15 transférés dans le vecteur d'expression d'HBsAg. Le bactériophage M13tg130 est un vecteur de clonage et de séquençage portant au niveau du cinquième codon du gène lacZ de E. coli, un polylinker (polyadaptateur) contenant 11 sites de restriction uniques. Des fragments 20 d'ADN du génome de HIV coupés au hasard et comprenant de 50 à 1000 paires de base, ont été clonés dans les sites SmaI et EcoRV du bactériophage M13tg130 (figure 1). L'hybridation *in situ* et le séquençage ont permis de repérer précisément le fragment cloné dans la région 25 codant pour l'enveloppe de HIV1.

Les fragments de HIV sélectionnés ont été transférés dans le vecteur d'expression de HBsAg, pSV2S (figure 1). pSV2S est obtenu par modification d'un vecteur d'expression pSVS précédemment décrit dans la 30 partie "Matériaux et Méthodes". pSVS comprend la séquence de SV40 contenant l'origine de réplication, les promoteurs tardif et précoce, l'activateur et les sites d'initiation de l'ARN_m. On trouve au voisinage immédiat du promoteur précoce, des séquences de HBV contenant la 35 région génomique pré-S2, le gène S, et une séquence

permettant la polyadénylation de l'ARN messager de l'HBsAg. Dans le vecteur pSV2S, la partie de la région pré-S2 a été déletée et remplacée par le polyadaptateur M13tg130. Dans cette construction, le polyadaptateur 5 permet l'insertion d'un fragment d'ADN en phase avec la région pré-S2 et le gène S. Ainsi, tout fragment cloné dans le cadre de lecture correct du gène LacZ dans le bactériophage M13tg130 peut être facilement transféré en phase avec le gène S dans le vecteur d'expression pSV2S.

10 Un autre dérivé de pSVS est le vecteur pSVS XL dans lequel l'adaptateur M13tg130 permet aisément l'insertion en phase d'une séquence exogène dans la région pré-S2. Dans cette construction, les antigènes pré-S1 et pré-S2 sont exprimés de façon adjacente avec 15 l'antigène étranger.

15 Parmi les fragments correspondant à l'enveloppe de HIV et obtenus dans la banque, trois ont été étudiés en détail.

20 Le clone n°2 contient un insérat de HIV formé de 52 paires de bases (bp) (nucléotides 6440 à 6491), situé dans la partie médiane dans la séquence codant pour la GP120 (figure 2). Il couvre une région conservée entre les différents isolats de HIV1 (3).

25 Le clone n°8 contient un insérat de HIV de 252 paires de bases (nucléotides 6915 à 7166), correspondant à la partie sub-carboxyterminale de la protéine GP120 (figure 2). Cette région est relativement bien conservée parmi les différents isolats et présente une homologie avec la région constante de la chaîne lourde de 30 l'immunoglobuline (référence 24). De plus, une partie du fragment d'ADN code pour un domaine impliqué dans l'attachement de la protéine GP120 au récepteur du virus, la molécule CD4 (référence 25).

35 Le clone n°6 contient un insérat de HIV ayant 55 paires de bases (nucléotides 7306 à 7360) situé dans une

région codant pour la partie amino-terminale de la protéine transmembranaire GP41. Cette région est conservée dans les isolats de HIV et partage une homologie avec la protéine de fusion d'autres virus
5 (26).

Expression des protéines de fusion HIV-HBV dans les cellules transfectées

Les vecteurs d'expression de HBsAg contenant les fragments du gène d'enveloppe de HIV-1 ont été utilisés
10 pour transfecter des cellules CHO. Les clones stables exprimant HBsAg, détectés par un test RIA spécifique pour la protéine majeure d'enveloppe d'HBV ont été criblés pour détecter l'expression du gène hétérologue. Ils ont ensuite été caractérisés par analyse selon la
15 méthode dite "Northern blot" et l'ARN messager hybride a été observé. Les particules secrétées ont ensuite été purifiées à partir du surnageant de culture cellulaire par un procédé utilisé pour les particules de HBsAg (11). Les particules recombinantes HIV-HBsAg ont à peu
20 près la même densité dans un gradient CsCl que les particules natives. Les protéines des particules recombinantes ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide NaDODSO₄, transférées sur des filtres de nitrocellulose et testées avec des antiséra
25 obtenus à partir de lapin et dirigés contre le peptide synthétique correspondant soit à la particule HBsAg soit aux déterminants de l'enveloppe de HIV (figure 3).

Les résultats suivants ont été observés :

Particule recombinante n°2 : en plus de la
30 protéine majeure HBsAg et de la protéine correspondante sous forme glycosylée GP26, le sérum anti-p49a a révélé 4 bandes dans l'intervalle de 27 000 à 32 000 daltons correspondant à la protéine moyenne (figure 3A, ligne 1). les 4 bandes sont également fortement révélées par
35 un sérum dirigé contre le peptide de HIV1 homologue

(pep 5) (figure 3A, ligne 1). Ceci a montré que la particule recombinante HBsAg n°2 porte un déterminant étranger. Les quantités de protéines moyenne et majeure sont pratiquement les mêmes. La protéine moyenne fusionnée est présente sous quatre formes, en fonction de la glycosylation des régions de HBV (1 site de glycosylation) et de HIV (2 sites possibles de glycosylation).

Particule recombinante n°8 : Le sérum anti-p49a a révélé une protéine majeure de HBsAg sous deux formes (P22 et GP26) ainsi que des bandes correspondant à un poids moléculaire s'étendant de 37 000 à 46 000 (figure 3B, ligne 1). Des séra dirigés contre deux peptides homologues n° 6 et n° 7 ont révélé la même répartition de protéines lourdes (figure 3B, lignes 2 et 3) démontrant la présence d'un déterminant de HIV dans les particules. La quantité de protéine moyenne fusionnée est moins importante que la quantité de protéine majeure. La protéine de 37 kd correspond à la protéine fusion non glycosylée et les protéines de plus de haut poids moléculaire correspondent aux formes glycosylées (5 sites possibles de glycosylation dans la partie HIV). Les séra anti-peptides ont également révélé une protéine de 67 kd qui correspond à la sérum-albumine co-purifiée.

Particule recombinante n°6 : le sérum anti-p49a a révélé une protéine majeure HBsAg et sa contrepartie glycosylée mais n'a pas révélé de protéine moyenne (figure 3C, ligne 1). Un triplet de bandes de hauts poids moléculaires a été observé ; il est aussi révélé par un anticorps monoclonal contre l'antigène pré-S1 (figure 3C, ligne 2). La taille de ces protéines est compatible avec celle de la grande protéine HBsAg, comprenant le peptide étranger dans ses formes glycosylée et non glycosylée.

Réponse immunitaire humorale à des particules recombinantes HBsAg

Des lapins ont été immunisés deux ou trois fois à un mois d'intervalle, avec chacune des particules recombinantes HBsAg ci-dessus, dans un adjuvant de Freund complet (voir "Matériaux et Méthodes"). La spécificité de la réponse immunitaire a été déterminée par un test ELISA en utilisant des particules dérivées du plasma et différents peptides correspondants de HIV1. 5 Des antiséra ont également été testés contre les peptides pré-S2 (séquence d'acides aminés de la protéine d'enveloppe de l'HBV comprise entre les numéros 120 à 145 inclus) (tableau 1).

Tous les lapins ont développé des anticorps 10 contre les particules HBsAg natives, à différents niveaux. La plus faible réponse a été obtenue pour le recombinant n° 8, ce qui peut s'expliquer par la taille relativement grande de l'antigène étranger (84 acides aminés) qui peut entrer en compétition avec les déterminants HBsAg ou les masquer. Au contraire, la meilleure 15 réponse dirigée contre le peptide étranger a été obtenue avec ce recombinant n° 8, ce qui suggère dans ce cas une présentation prédominante des déterminants antigéniques HIV vis-à-vis des déterminants antigéniques de HBsAg.

20 Dans les recombinants n° 2 et n° 6, les antigènes exogènes appartenant à HIV sont plus petits et de taille comparable (18 acides aminés et 20 acides aminés). Les 25 réponses dirigées contre les peptides observés dans les deux cas sont plus faibles que celles dirigées contre les particules HBsAg natives. Le taux de protéine de fusion vis-à-vis de la protéine majeure native est élevé dans le recombinant n° 2 (voir figure 3). Ces résultats 30 suggèrent une faible immunogénicité de la séquence insérée dans ce recombinant. Une réponse avec les 35 peptides pré-S2 est obtenue uniquement pour le

recombinant n°6 résultant de l'expression dans le vecteur pSV XL (figure 1). Des antiséra des deux autres lapins immunisés avec des particules obtenues par expression dans le vecteur pSV2S sont négatives et 5 servent de contrôle.

Neutralisation de l'infection due à HIV in vitro par des séra immuns dirigés contre les particules recombinantes n°8

Des lapins ont été immunisés avec des particules 10 recombinantes HIV-HBsAg et les séra ont été testés pour connaître leur capacité à neutraliser l'isolat LAV1_{BRU} (24). L'infection virale dans les lymphocytes du sang périphérique a été étudiée grâce à l'activité reverse-transcriptase (RT) pendant trois à quinze jours. L'essai 15 réalisé est fondé sur la réduction de l'activité RT en présence de sérum immun, le résultat étant comparé au résultat obtenu en présence de sérum pré-immun du même lapin.

Dans ce test, les anticorps ne peuvent pas neutraliser efficacement le virus si des quantités saturantes de virions infectieux sont présentes. 20

C'est pourquoi les tests ont été réalisés à partir des différents antiséra dilués (1:50) pour neutraliser les différents échantillons de virus (figure 25 4A, 4B, 4C). Le sérum du lapin immunisé avec la particule recombinante n°8 a neutralisé intégralement l'infectivité virale du virus le moins infectieux (figure 4) et on a observé une diminution de l'activité RT de 95 % à 63 % et 35 % lorsque l'on a augmenté 30 l'infectivité de l'échantillon viral (figure 4D). Ceci montre que la capacité de neutralisation des antiséra est fonction de la quantité de virus.

Des antiséra correspondant aux particules recombinantes n°6 ont donné une neutralisation faible à une

faible concentration de virus mais on n'a pas pu détecter une réduction de l'activité RT avec l'antisérum de lapin immunisé avec le recombinant n° 2, même à une faible concentration de virus.

5 De plus, la neutralisation de différents isolats de HIV1 a été examinée en utilisant une concentration constante de virus avec une dilution variable des antiséra dirigés contre la particule recombinante n°8.

10 La figure 5 montre une réduction de 50 % de la capacité infectieuse de l'isolat LAV_{BRU} avec une dilution 1/50 comparée au sérum pré-immun.

15 L'activité neutralisante de cet anti-sérum contre l'isolat zairois de HIV1 a également été montrée : un effet neutralisant de 50 % a été observé à une dilution 1/25, sur LAV_{ELI} (3) (figure 5).

DISCUSSION

20 la glycoprotéine interne d'enveloppe de HIV1, GP120, a priori intéressante pour sa capacité à induire une réponse immunitaire protectrice vis-à-vis de HIV, contient des régions conservées et d'autres régions variables entre les différents isolats de HIV. Les séquences conservées à l'intérieur des domaines constants pourraient correspondre à des régions de séquences ayant une importance fonctionnelle potentielle. Comme le montrent les résultats rapportés plus haut, ces différentes régions conservées de l'enveloppe de HIV1 ont été choisies et exprimées sous forme de protéines de fusion avec la protéine moyenne de l'antigène de surface de l'hépatite B.

25 30 La particule HBsAg présente de bonnes propriétés immunogènes selon deux aspects exploités par les inventeurs :

35 i) c'est un polymère de haut poids moléculaire portant à sa surface de nombreuses copies de déterminants antigéniques ;

iii) elle porte également des épitopes T qui peuvent être utiles dans la reconnaissance d'épitopes B étrangers par le système immunitaire (27).

5 Parmi les trois différentes régions conservées de HIV étudiées plus haut, l'une d'entre elles (clone n°8) est liée au site de liaison CD4 (25), une autre (clone n°6) pourrait être impliquée dans le processus de fusion (26), et la troisième (clone n°2) n'est reliée à aucune activité biologique connue.

10 Les particules recombinantes HIV-HBsAg obtenues par fusion de ces déterminants antigéniques avec le produit du gène de la région pré-S2 ont été étudiées en utilisant des anticorps dirigés contre des peptides homologues synthétiques. Des analyses Western-blot ont 15 permis de mettre en évidence la présence des déterminants antigéniques HIV sur les particules et la glycosylation probable des protéines de fusion. Les taux de protéine de fusion et de protéine native majeure observés dans les différentes particules recombinantes 20 sont variables. Pour le recombinant n°8, la protéine de fusion est apparemment moins abondante, ce qui peut être lié à la taille relativement importante de la séquence étrangère insérée. La taille d'origine du produit de traduction pré-S2 de HBV est de 55 acides aminés alors 25 que la construction de protéine de fusion augmente cette taille jusqu'à 111 acides aminés. La taille de la protéine à fusionner pourrait contrarier son insertion dans les particules de HBsAg.

30 Pour les recombinants n°6 et n°2, le taux entre la protéine de fusion et la protéine majeure est comparable à celui observé entre la protéine moyenne et la protéine majeure dans les particules obtenues par transfection du vecteur d'expression pSVS des particules HBsAg d'origine (11).

35 L'immunogénicité des particules recombinantes

HIV-HBsAg a été rapportée plus haut. La réponse humorale est dirigée contre deux régions antigéniques et montre que les épitopes étrangers sont présents de façon efficace à la surface des particules.

5 L'activité biologique des anticorps a été testée lors d'essais de neutralisation *in vitro*. Des épitopes neutralisants et non-neutralisants ont été mis en évidence dans les protéines d'enveloppe de HIV. Des anticorps dirigés contre les recombinants n°8 ont un effet neutralisant potentiel sur l'isolat HIV (LAV_{BRU}) utilisé à l'origine pour fabriquer des protéines de fusion. Un effet plus faible a été observé lorsque les anticorps ont réagi avec un isolat de HIV1 différent (LAV_{ELI}). 10 L'insérat de HIV utilisé dans le recombinant n°8 couvre 15 deux régions relativement bien conservées parmi les différents isolats HIV1, ces deux régions étant séparées par une région hypervariable caractéristique de l'isolat. Dans cette région, CEASE et al ont identifié un épitope de cellule T (30).

20 De plus, des expériences faisant appel à des anticorps monoclonaux dirigés contre la GP120 ainsi que des expériences de mutagénèse *in vitro* ont permis d'identifier une séquence importante pour l'interaction avec le récepteur CD4 (25). On sait également qu'une 25 protéine de fusion a été produite dans *E. coli* portant une séquence chevauchant en partie la séquence précédemment utilisée et capable de conduire à la formation d'anticorps neutralisants et à une réponse immunitaire cellulaire (31). Dans le système HBsAg, les protéines de fusion peuvent être glycosylées normalement, ce qui peut 30 être un élément important pour la production d'anticorps ayant une forte affinité vis-à-vis des épitopes et capables de bloquer l'interaction de la protéine d'enveloppe de HIV et du récepteur CD4. De plus, le déterminant 35 antigénique de HIV semble mieux exposé à la surface des

particules que dans la protéine virale native GP. L'efficacité inférieure de la neutralisation observée avec l'isolat zairois LAV_{ELI} peut être attribuée à la variation de la séquence d'aminoacides d'environ 30 % dans 5 une région déterminante pour l'interaction entre le virus et le récepteur CD4 (25).

Les anticorps dirigés contre les recombinants n°2 et n°6 ont également été testés dans des expériences de neutralisation. Les séquences de HIV portant le 10 recombinant n°2 n'ont pas induit d'anticorps neutralisants lors de ces expériences. Une réponse immunitaire faible des animaux utilisés ou une faible immunogénicité de la région impliquée dans le recombinant n°2, pourrait expliquer ce résultat. La partie amino-terminale de la 15 GP41 pourrait être impliquée dans le processus de fusion et en conséquence dans la neutralisation virale.

De même, l'effet potentiel des anticorps obtenus par immunisation avec le recombinant n°6 vis-à-vis de l'infectivité de HIV1 a été testée. L'effet neutralisant 20 est faible et l'inhibition de la formation des syncitia n'est pas complète. Ce résultat pourrait être attribué à à la taille limitée de l'insérat de HIV.

Les inventeurs ont donc réalisé un système potentiellement capable de permettre la présentation des 25 déterminants antigéniques étrangers de l'enveloppe de HIV, ce système permettant en outre la production d'anticorps neutralisants dirigés contre une région de la protéine d'enveloppe qui présenterait sous forme native des propriétés immunogéniques faibles ou ne 30 serait pas présentée à la surface dans cette protéine native.

Par ailleurs, la juxtaposition de déterminants antigéniques de HBV et de HIV à la surface de la même particule immunogénique peut permettre la réalisation de 35 vaccins polyvalents.

D'autres caractéristiques et propriétés de l'invention apparaîtront dans les figures qui suivent dont les légendes sont données ci-après.

- Figure 1

5 Vecteur d'expression et de clonage des fragments du gène de l'enveloppe de HIV. M13tg130 est un vecteur de clonage des fragments d'ADN de HIV. La région hachurée représente la partie N-terminale du gène de la β -galactosidase. Dans cette région, on trouve un
10 adaptateur présentant de multiple sites de clonage. El : EcoRI, S_{ma} : SamI, S₃ : SstI; EV : EcoRV, Sp : SphI, K : KpnI, X_b : XbaI, H : HindIII, B : BamHI, Sa : SalI, P : PstI.
PSVS, pM2S, pSV2S et pSVS XL sont des vecteurs d'expression.
15 Xh : XhoI

- Figure 2

Représentation schématique de la séquence d'acides aminés des fragments d'enveloppe de HIV fusionnée avec HBsAg. Le système de numérotation est celui qui a été donné par ALIZON et al dans l'article cité sous la référence (3). Les points et les flèches correspondent respectivement aux sites potentiels de glycosylation et aux cystéines conservées. Les séquences des 4 peptides 25 représentent les régions conservées entre les isolats de HIV1 et de HIV2.

- Figure 3

Analyse Western-blot des particules recombinantes de HBsAg. Les particules recombinantes n°2 (A), n° 30 8 (b), n°6 (C), ont réagi avec : un sérum ant-p49a dilué à 1:500 (lignes A1, B1, C1), un antisérum anti-peptide 5 (ligne A2), un antisérum anti-peptide 6 (ligne B2), un antisérum anti-peptide 7 (ligne B3) à une dilution de 1:25 et à une dilution de 1:200 d'un anticorps monoclonal 35 18/7 (ligne C2). Les tailles sont données en kilodaltons.

- Figure 4

Test de neutralisation : la cinétique de la neutralisation in vitro des différents échantillons de virus (A, B, C) par un antisérum dilué à 1:50 obtenu 5 après immunisation d'un lapin avec le recombinant n°8 (o---o) ou avec un sérum pré-immun (o—o). L'activité réverse transcriptase a été déterminée par l'incorporation de ^{3}H thymidine triphosphate (en cpm). Sur le graphique D, chaque point représente le pourcentage 10 d'inhibition RT pour A, B, C calculé comme suit
cpm test RT sur culture avec sérum immun

 $\times 100$

cpm test RT sur culture avec sérum pré-immun

- Figure 5

15 Neutralisation de HIV avec un sérum immun de lapin dirigé contre le recombinant n° 8: Des séra pré-immun (ligne continue) et immun (ligne pointillée) ont été testés pour connaître la neutralisation du virus dans des cultures cellulaires, en utilisant deux isolats 20 différents LAV_{BRU} (cercles) LAV_{ELI} (triangles). L'activité reverse transcriptase a été mesurée après 7 à 10 jours dans des surnageants de cultures cellulaires.

- Figure 6

Sequences des protéines d'enveloppe des 25 ténies d'enveloppe des rétrovirus SIV_{mac}, HIV-2, HIV-1. Dans cette figure les tirets apparaissant dans les séquences ont pour seul objet de permettre l'alignement des séquences. Ces tirets n'ont donc pas de signification scientifique.

30 L'immunogénicité des particules préférées de l'invention peut également être attribuée à la glycosylation vraisemblable des peptides issus de HIV à l'occasion de l'expression des vecteurs recombinants sus-définis.

35 Dans ce qui précède la région contenant la

séquence d'acides aminés immunogène de HIV et son site d'attachement à des récepteurs CD4 des lymphocytes T4 provenaient le plus souvent d'une séquence commune appartenant à une glycoprotéine de surface ou trans-
5 membranaire de HIV. Il va de soi que chacune de ces séquences peut provenir de régions éloignées l'une de l'autre dans les protéines naturelles de HIV. Dans ce dernier cas, elles consisteraient de préférence en une séquence recombinante ou en un polypeptide recombinant
10 résultant de l'expression de deux séquences codées par les régions correspondantes du génome de HIV, voire même de HIV appartenant à des isolats différents.

Dans ce qui précède il a également été remarqué que de préférence on avait recours à des séquences issues de HIV mais bien conservées dans les divers isolats disponibles de HIV. Il va néanmoins de soi que l'on peut avoir recours même à des séquences moins bien conservées d'un isolat à l'autre. Dans une telle hypothèse, l'invention concerne également des compositions
20 de particules répondant à la définition qui en a été donnée plus haut, ces particules se distinguant cependant les unes des autres en ce qu'elles contiennent des séquences d'acides aminés communes avec des régions des glycoprotéines correspondantes d'isolats différents.

25 L'invention concerne enfin les séquences d'acides aminés préférées issues de HIV, qui étaient identifiées dans le cadre de la présente description, par conséquent aussi les séquences d'ADN qui codent pour elles (comme d'ailleurs les polypeptides produits par
30 synthèse chimique et présentant des propriétés immunologiques semblables, ainsi que toutes séquences d'acides nucléiques codant pour ces polypeptides, qu'il s'agisse de séquences naturelles ou produites par synthèse nucléotidique).

34

En particulier les séquences d'acides aminés ci-dessus peuvent être utilisées pour la production de principes actifs de vaccins comprenant à titre de support une bactéries E.coli et, affleurant à la surface de cette bactéries, les séquences peptidiques sus-indiquées de HIV. Pour la production de tels vaccins on peut avoir recours à la technique décrite dans la demande de brevet européen déposée le 6 Mars 1987 et publiée sous le numéro 0242.243.

10

15

20

25

30

35

5
10
15
20
25
30
35

TABLEAU I

Antisera de lapin dirigés contre les particu- les recombinantes HIV-HBcAg	Antigène immobilisé	HBcAg dérivé du plasma	Pre-S2 (120-165)	Peptide 52 (120-165)	Peptide 5	Peptide 6	Peptide 7	Peptide F
n° 2 (2 x 3,5 µg)*		10 ⁻⁴	0		4.10 ⁻²	-	-	
n° 8 (2 x 3,5 µg)*		10 ⁻³	0	-	-	2.10 ⁻³	5.10 ⁻²	
n° 6 (3 x 5 µg)*		5.10 ⁻⁵	1,6.10 ⁻³	-	-	-	-	10 ⁻³

Tableau I : titres et spécificités des antiséras de lapin dirigés contre les particules recombinantes. Les titres sont exprimés par la réciprocité de la dilution du sérum donnant le triple de la densité obtenue avec un sérum pré-immun à la même dilution (=sérum témoin au jour 0).

* : Les nombres entre parenthèses font référence à des doses d'injection.

REFERENCES

1. Allan, J.S. et al. (1985) *Science* 228, 1091-1093.
2. Robey, W.G. et al. (1985) *Science* 228, 593-595.
3. Alizon, M. et al (1986) *Cell* 46, 63-74.
4. Starcich, B.R. et al (1986) *Cell* 45, 637-648.
5. McDougal, J.S. et al (1986) *Science* 231, 382-385.
6. Robey, W.G. et al (1986) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7023-7027.
7. Lasky, L.A. et al (1986) *Science* 233, 209-212.
10. Putney, S.D. et al (1986) *Science* 234, 1392-1395.
9. Chanh, T.C. et al (1986) *EMBO J.* 5, 3065-3071.
10. Tiollais, P. et al (1985) *Nature* 317, 489-495.
11. Michel, M.L. et al (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 81, 7708-7712.
15. Neurath, A.R. et al (1984) *Science* 224, 392-394.
13. Machida, A. et al (1984) *Gastroenterology* 86, 910-918.
14. Kieny, M.P. et al (1983) *Gene* 26, 91-99.
15. Urlaub, G. et al (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216-4220.
20. Parker, B.A. et al (1979) *J. Virol.* 31, 360-369.
17. Subramani, S. (1981) *Molecular and Cellular Biology* 1, 854-864.
18. Michel, M.L. et al (1985) *Biotechnology* 3, 561-566.
25. 19. Gerin, J.L. et al (1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 2365-2369.
20. Heermann, K.H. et al (1984) *J. Virol.* 52, 396-402.
21. Charbit, A. et al (1987) *J. Immunology* 139, 1658-1664.
22. Montagnier, L. et al (1984) In *Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus*, ed. Gallo, R.C., Essex, M. & Gross, L. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York), pp. 363-370.
30. 23. Rey, M.A. et al (1984) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 121, 126-133.
35. 24. Maddon, P.J. et al (1986) *Cell* 47, 333-348.

37

25. Lasky, L.A. et al (1987) Cell 50, 975-985.
26. Gallaher, W.R. et al (1987) Cell 50, 327-328.
27. Milich, D.R. et al (1986) J.Exp. Med. 164, 532-547.
28. Valenzuela, P. et al (1985) Biotechnology 3, 323-326.
- 5 29. Delpeyroux, F. et al (1986) Science 233, 472-475.
30. Cease, K.B. et al (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 4249-4253.
31. Krohn, K.D. et al (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 4994-4998.
- 10 32. Kowalski, M. et al (1987) Science 237, 1351-1355.

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

- 1/ Vecteur recombinant, comprenant un fragment d'acide nucléique correspondant à la région S et le cas échéant à tout ou partie de la région pré-S de l'antigène majeur de surface du virus de l'hépatite B, et permettant, lorsqu'il est introduit dans un hôte cellulaire eucaryote compétent, et à l'occasion de la culture de l'hôte cellulaire ainsi transformé, d'induire la production de particules ayant les caractéristiques morphologiques essentielles de l'antigène HBsAg, et, de préférence l'excrétion de ces particules dans le milieu de culture, caractérisé
 - en ce qu'il comprend en outre une séquence nucléotidique exogène codant pour une séquence d'acides aminés immunogène induisant des anticorps neutralisants vis-à-vis d'un rétrovirus de la famille de HIV ou susceptible d'être reconnue par de tels anticorps, comprenant au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes B, et au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes T, et
 - en ce que ladite séquence nucléotidique exogène est soit insérée dans ladite région pré-S, soit substituée à tout ou partie de la dite région pré-S.
- 2/ Vecteur recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène code pour une séquence d'acides aminés immunogène comprenant en outre au moins un site d'attachement au récepteur CD4.
- 3/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le susdit fragment d'acide nucléique est placé sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases d'un hôte cellulaire eucaryote.

4/ Vecteur recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur issu de SV40.

5/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique insérée est substituée à la totalité de la région pré-S.

10 6/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène est insérée dans la partie pré-S2 de la région pré-S.

15 7/ Vecteur recombinant selon la revendication 6, caractérisé en ce que la région pré-S2 de part et d'autre de la séquence insérée a pour l'essentiel été déletée.

20 8/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène insérée comprend une séquence codant pour l'une des séquences d'acides aminés suivantes :

25 X₁ CHIRQIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z₁
X₂ CHIKQIINTWHKVRNVYLPPREGELSC Z₂
X₃ CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z₃
dans lesquelles les couples X₁, Z₁ ; X₂, Z₂ et X₃, Z₃ représentent soit des groupements COOH ou NH₂ soit des séquences d'acides aminés comprenant normalement respectivement associées aux parties centrales correspondantes des séquences sus-indiquées dans les glycoprotéines des rétrovirus SIV, HIV-2, HIV-2 qui normalement les contiennent.

30 9/ Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique exogène insérée code pour tout ou partie de l'une des séquences suivantes :

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLTQKPKERHKRNYVPCHIROQIINTWHKVGKNVYLP
PREGDLTCNSTVTSILIANINWTDG

RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGRNVYLPPREGELSCNS
TVTSIIANIDWQNN

5 GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNN

10/ Vecteur recombinant selon la revendication 6,
Caractérisé en ce qu'il est dérivé du vecteur pM2S.

11/ Vecteur recombinant selon la revendication 7,
10 caractérisé en ce qu'il est dérivé du vecteur pSV2S.

12/ Particules recombinantes présentant les caractéristiques morphologiques essentielles des particules de HBsAg, et comprenant, affleurant à la surface de ces particules, l'essentiel de la séquence d'acides 15 aminés (S) correspondant à la région S et le cas échéant à tout ou partie de la séquence d'acides aminés correspondant à la région pré-S du génome du virus de l'hépatite B, en amont de ladite séquence d'acides aminés (S), ces particules recombinantes étant caractérisées en ce 20 qu'elles comprennent en outre, une séquence d'acides aminés immunogène induisant des anticorps neutralisants vis-à-vis d'un rétrovirus de la famille HIV ou susceptible d'être reconnue par de tels anticorps, cette séquence comprenant elle-même au moins un épitope susceptible 25 d'être reconnu par les lymphocytes B, ou au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes T, cette séquence immunogène étant, soit insérée dans la séquence d'acides aminés pré-S, soit substituée tout ou partie de la protéine pré-S.

30 13/ Particules recombinantes selon la revendication 12, caractérisées en ce que la séquence d'acides aminés immunogène comprend en outre un site d'attachement au récepteur CD4 de lymphocytes T4 humains.

14/ Particules recombinantes selon l'une quelconque des revendications 12 ou 13, caractérisées en ce que la séquence d'acides aminés immunogène est soit insérée dans la séquence d'acides aminés codée par la région 5 pré-S2 du génome du virus de l'hépatite B, soit substituée à tout ou partie de la séquence d'acides aminés pré-S2.

15/ Particules recombinantes selon l'une quelconque des revendication 12 ou 13, caractérisées en ce que la 10 séquence d'acides aminés pré-S2 est, pour l'essentiel, déletée.

16/ Particules recombinantes selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, caractérisées par une activité immunogène lui permettant d'induire in vivo la 15 production d'anticorps protecteurs contre un rétrovirus de la classe des cette séquence comportant elle-même au moins cette séquence comportant elle-même au moins 5 pathogènes pour l'homme.

17/ Particules recombinantes selon l'une quelconque 20 des revendications 12 à 16, caractérisées en ce qu'elles ont pour l'essentiel perdu la faculté d'induire in vivo la production d'anticorps neutralisants à l'égard du virus de l'hépatite B.

18/ Particules recombinantes selon l'une quelconque 25 des revendications 12 à 17, caractérisées en ce que la séquence d'acides aminés immunogène insérée est choisie parmi les séquences ci-dessous :

X₁ CHIROIINTWHKVGKNVYLPPREGDLTC Z₁,
 X₂ CHIKQIINTWHKVGKNVYLPPREGELSC Z₂
 30 X₃ CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGQIRC Z₃
 dans lesquelles les couples X₁, Z₁ ; X₂, Z₂ et X₃, Z₃ représentent soit des groupements COOH ou NH₂ soit des

séquences d'acides aminés comprenant normalement respectivement associées aux parties centrales correspondantes des séquences sus-indiquées dans les glycoprotéines des rétrovirus SIV, HIV-2, HIV-1 qui normalement les contiennent.

5 19/ Particules recombinantes selon l'une quelconque des revendications 12 à 18, caractérisées en ce que la séquence d'acides aminés immunogène insérée est choisie parmi les séquences ci-dessous :

10 RGEFLYCKMWWFLNWVEDRSLTTQPKERHKRNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
PREGDLTCNSTVTSILIANINWTDG

RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKGRNVYLPPREGELSCNS
TVTSIIANIDWQNN

GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEWSNNTEGSDTTLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGGQIRCSSNITGLLTRDGGNN

15 20/ Hôte cellulaire d'origine eucaryote, caractérisé en ce qu'il est transformé par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, le rendant apte, lorsqu'il est mis en culture, à excréter des particules selon l'une quelconque des revendications 12 à 19.

20 21/ Hôte cellulaire selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule de mammifère.

25 22/ Hôte cellulaire selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une levure.

23/ Fragment immunogène d'acides aminés, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les fragments ci-dessous :

X₁ CHIRQIINTWHKVGKNVYLPREGDLTC z₁

30 X₂ CHIRQIINTWHKGRNVYLPPREGELSC z₂

X₃ CRIKQFINMWQEVGKAMYAPPISGGQIRC z₃

dans lesquelles les couples X₁, z₁ ; X₂, z₂ et X₃, z₃ représentent soit des groupements COOH ou NH₂ soit des séquences d'acides aminés comprenant normalement

35 respectivement associées aux parties centrales

correspondantes des séquences sus-indiquées dans les glycoprotéines des rétrovirus SIV, HIV-2, HIV-1 qui normalement les contiennent.

24/ Fragment selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de l'un des enchainements ci-dessous :

RGEFLYCKMNWFLNWVEDRSLSLTQKPKERHKRNYVPCHIRQIINTWHKVGKNVYLP
PREGDLTCNSTVTSLIANINWTDG

RGEFLYCNMTWFLNWIENKTHRNYAPCHIKQIINTWHKVGGRNVYLPPREGELSCNS

10 TVTSIIANIDWQNN

GGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPCRIKQFINMWQEVGKAM
YAPPISGQIRCSSNITGLLTRDGGNN

25/ Acide nucléique, caractérisé en ce qu'il code pour l'une des séquences d'acides aminés immunogènes selon la revendication 23 ou 24.

26/ Composition vaccinante destinée à la protection contre une infection par un rétrovirus de la famille de HIV, caractérisée en ce que son principe actif est formé, des particules recombinantes selon l'une quelconque des revendications 12 à 19, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

27/ Procédé de préparation d'un vecteur recombinant, caractérisé par les étapes suivantes :

- la recombinaison *in vitro* et le cas échéant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases d'un hôte cellulaire eucaryote, d'une part d'une séquence nucléotidique exogène codant pour une séquence d'acides aminés immunogène, induisant des anticorps neutralisants vis-à-vis d'un rétrovirus de la famille de HIV ou susceptible d'être reconnue par de tels anticorps, et comprenant au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes B, au moins un épitope susceptible d'être reconnu par les lymphocytes T et le cas échéant un site d'attachement au récepteur CD4, et d'autre part un 35 enchainement de nucléotides correspondant à la région 5

et le cas échéant à tout ou partie de la région pré-S, du génome du virus de l'hépatite B.

- la récupération du vecteur recombinant formé comprenant les éléments, tels qu'ils ont été définis plus haut.

5 28/ Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés immunogène correspond à l'insérat défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.

10 29/ Composition pour le diagnostic d'une infection due au rétrovirus HIV par la détection de la présence d'anticorps neutralisants dans un milieu biologique prélevé chez un patient, comprenant des particules recombinantes eslon l'une quelconque des revendications 15 18 ou 19 et/ou un fragment immunogène selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24 ou un mélange de ces composants.

20 30/ Test pour le diagnostic in vitro d'une infection due à HIV par la détection de la présence d'anticorps neutralisants dans un milieu biologique prélevé chez un patient, caractérisé par :

- la mise en contact, dans des conditions appropriées, d'une composition selon la reendication 29 avec le milieu biologique testé,

25 - la détection de la formation d'un complexe antigène-anticorps.

31/ Procédé pour la production de particules recombinantes selon l'une quelconque des revendications 12 à 19 caractérisé par :

30 - la transformation d'un hôte cellulaire déterminé avec un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 11,

- la culture de l'hôte cellulaire transformé sur un milieu approprié et

35 - la récupération des particules recombinantes formées.

2635532

1/6

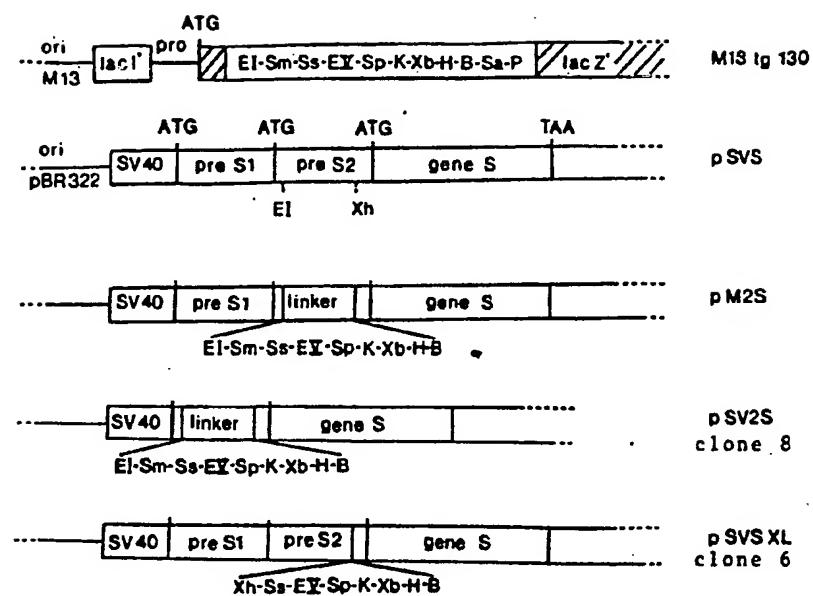
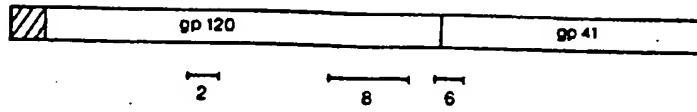


Figure 1

2635532

2/6



clone 2

224 PAGFAILKCNKTFNGTG

HYCAPAGFAILKCN

pep 5

clone 8

384 GGEFFYCNSTOLFNSTWFNSTWSTEOSNNTEGSDTITLPCRIKOFINMWOEVGKAMYAPPISGQIRCSSNTGLLTRDGGNN
DPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTOLFNS LPCRIKOFINMWOEVGKAMYA

pep 6

pep 7

clone 6

514 EKRAVQIGALFLGFLGAAGS

FL6FLGAAGST

pep F

Figure 2

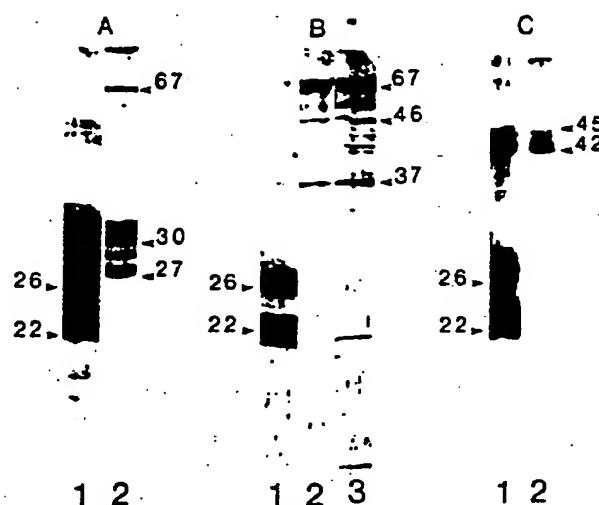


Figure 3

2635532

3/6

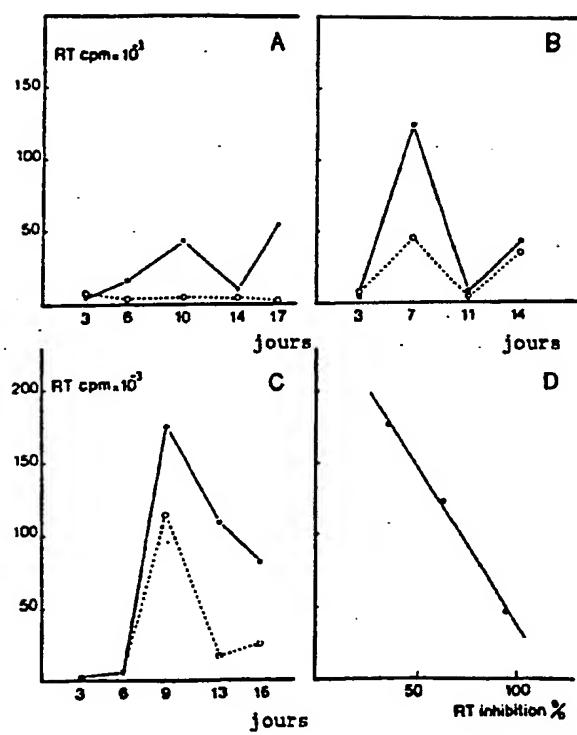


Figure 4

2635532

4/6

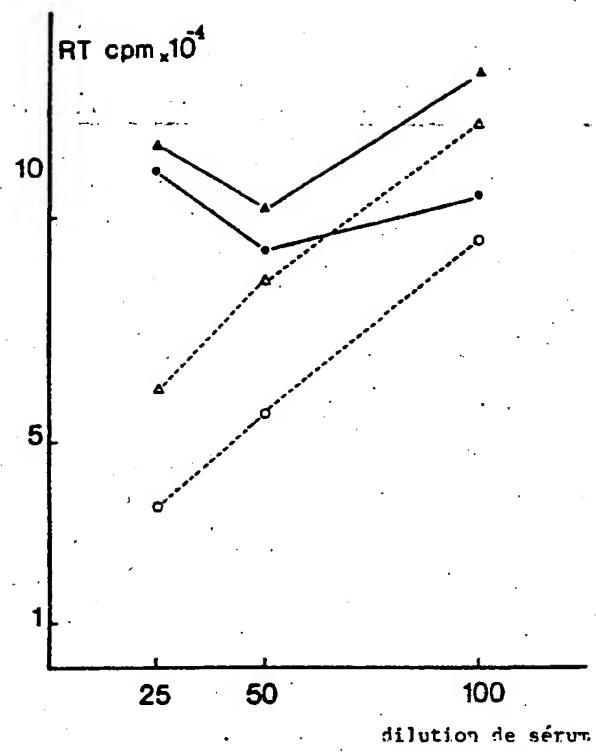


Figure 5

2635532

5/6

Figure 6

6/6

Line 8

SIV-MAC TYSLIMIIMUTDGTSIVMSAEVELVAL—ELGOVKLYEITPIGLAPTHKBYTIGGIRSHEDGVFUG—FLGFLATAGSANGAS—LTVAOSR 558
 HIV-2 TYSKIANIOMONHQTWTTEAELVYL—ELGOVKLYEITPIGFAPTEKEHSSANG-AMRCVFLG—FLGFLATAGSANGAS—LTVAOSR 541
 HIV-1 NTYGLLUTDGCHWCTSEFRGGGOMDRNURTELYKVVKIEPLGVAPTEAKR—VWRETEKAVG—GALFLGEAGASTNGARSLTIVS—R 547

SIV-MAC TLLAGVODDOLVVKRQELLRLTVMGKMLQTVSALKVLDALMANAGAFROVNTIVPH—PHSLYDPMNETHOEMERKDFLEANT 655
 HIV-2 TLLAGVODDOLVVKRQELLRLTVMGKMLQTVSALKVLDALMANAGAFROVNTIVPH—VHDLAPDMDHKOEMEKVYLEANT 638
 HIV-1 QLLGIVODONMLRICAQHLLATVNGIKALGARLAVERVLYKDOOLGIMHCKL 648

SIV-MAC ALLEAQDQEMKVELOKLMSDVGNFOLTSWIKYIQCIVIIVGULLRIVIVVOMLAALKGYRW—FSSPSVYFOMTHQDOPALPKEGKKD 755
 HIV-2 KLEAQDQEMKVELOKLMSDVGNFOLTSWIKYIQCIVIIVGULLRIVIVVOMLAALKGYRW—FSSPSVYFOMTHQDOPALPKEGKKD 756
 HIV-1 SLEESONQDHEOELLFLOMKASLWNUFTTHWLUWYKIFINIVGGLVGLATIVFVFLSIVWVURQCVSPSCT———HLPYPRGPDRFEGIEE 741

SIV-MAC GCGSCGNTGKupolevTNEIROLIRLLTWFSTILLRAVQIOPFORLSAVLRRIGEVLAETLYLQCGSYFQAVDADRSATELAGANGEL 653
 HIV-2 LGSNGGCRVUPAFLAVIPLRQLLRL-AVSIHQLLSASFLVOLIVONRDM———LALAYFLQYCCMIDEOFQDAAKARATETLAC@KCL 631
 HIV-1 CGEDRDRSIALWCTSLA-LMDDLSLQFLFSVRLROLLIVTRIVELLG—-RACHEA———LKVWHLLOWSQELKMSAVSLHATIAVAECTRY 634

SIV-MAC MEALORGCRMLAIPRIRGQELTL 682
 HIV-2 MFLERIGCILAVPRIRGQELTL 656
 HIV-1 IEVVOCABRAIRHPRIRGQELTL 661

Figure 6 (suite n° 1)

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)